



УДК 547.466.96:602.017.1-018+616-097

ПИРИДОКСИЛОВЫЕ ЭФИРЫ АМИНОКИСЛОТ В ПЕПТИДНОМ СИНТЕЗЕ

© 2000 г. Л. Ю. Скляров[#], И. Н. Сбитнева, Н. А. Копина, И. Г. Сидорович

Государственный научный центр – Институт иммунологии, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24-2

Поступила в редакцию 19.10.98 г. Принята к печати 16.12.99 г.

Для пептидного синтеза предложено использовать пиридоксильный остаток, как многофункциональную защитную и модифицирующую группу. Модификация осуществлялась введением пиридоксильного остатка в свободные или частично защищенные пептиды, или, что более удобно, присоединением пиридоксильных эфиров аминокислот методами обычного пептидного синтеза без удаления пиридоксильной группы в конце синтеза. Пиридоксильный остаток использован в качестве спейсера в твердофазном синтезе пептидов. Присоединение к полимеру осуществлялось путем алкилирования гидроксильных групп или пиридинового ядра пиридоксильных производных хлорметилированным сополимером стирола с дивинилбензолом (обычный носитель Меррифилда). Рассматриваются потенциальные возможности использования пиридоксильных производных в синтезе линейных, мультиплетных и циклических пептидов.

Ключевые слова: пиридоксин-5'-иловые эфиры аминокислот; новые карбоксильные защитные группы; кетали; синтез пептидов.

ВВЕДЕНИЕ

Создание пептидной связи в случае синтеза как в растворе, так и с использованием полимерных носителей часто затруднено из-за низкой растворимости (солюватации) компонентов реакции. К сожалению, растворимость пептидов по мере их синтеза меняется (часто непредсказуемо), что вынуждает исследователей искать новые защитные [1] и активирующие группы, которые могли бы облегчить решение этой проблемы [2]. Успех синтеза часто зависит от физико-химических свойств защищенных пептидов [3, 4]. Одним из подходов к решению проблемы растворимости является использование производных аминокислот, несущих многофункциональные защитные группы, физико-химические свойства которых могут меняться в зависимости от наличия тех или иных дополнительных реакционноспособных радикалов в составе постоянной защитной группы [5]. Помимо влияния на растворимость синтезируемых пептидов дополнительные группы могут выполнять ряд других полезных функций, например, быть маркерами, нести заряд и определять биологические свойства получаемых соединений [6]. Физиологическая приемлемость и наличие

нескольких реакционноспособных групп в производных пиридоксина делает эти соединения перспективными для синтеза биологически активных аналогов пептидов, нуклеотидов, пептидометиков, ингибиторов ферментов, особенно с учетом того, что гетероциклические остатки – уникальные акцепторы водородных связей и комплексоны [7]. Это их качество обеспечивает контакт с молекулой рецептора или фермента, а возможность придания производным пиридоксина липофильных свойств, необходимых для успешной диффузии через клеточные мембраны, делает их перспективными для использования в качестве медицинских препаратов [8]. Исходя из вышесказанного, нами были разработаны методы получения промежуточных продуктов – кетальных, ацильных и аминокетальных производных пиридоксина [9] и показана принципиальная возможность их использования в пептидном синтезе (предварительное сообщение на Европейском пептидном симпозиуме [10]).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данная работа посвящена различным аспектам использования пиридоксильных производных и особенностям проведения различных стадий пептидного синтеза с пиридоксильной группой. Мы показали, что стадия образования пептидной связи с такими производными протекает без осложнений благодаря высокой растворимости пиридоксильных эфиров – как исходных пептидов со снятой N^α-защитной группой, так и образующихся в

Сокращения: Prg – пиридоксил; iPrg5' – 4',3-*O*-изопропилиденпиридоксин-5'-ил; cPrg5' – 4',3-*O*-циклогексиденпиридоксин-5'-ил; (OPIm)₂Prg5' – 4',3-*O*-дипальмитоилпиридоксин-5'-ил; Fmoc – флуоренилметилоксикарбонил; ClZ – 4-хлорбензилоксикарбонил; For – формил; (Boc)₂O – ди-*tert*-бутилоксикарбонилпирокарбонат.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 111-83-44).

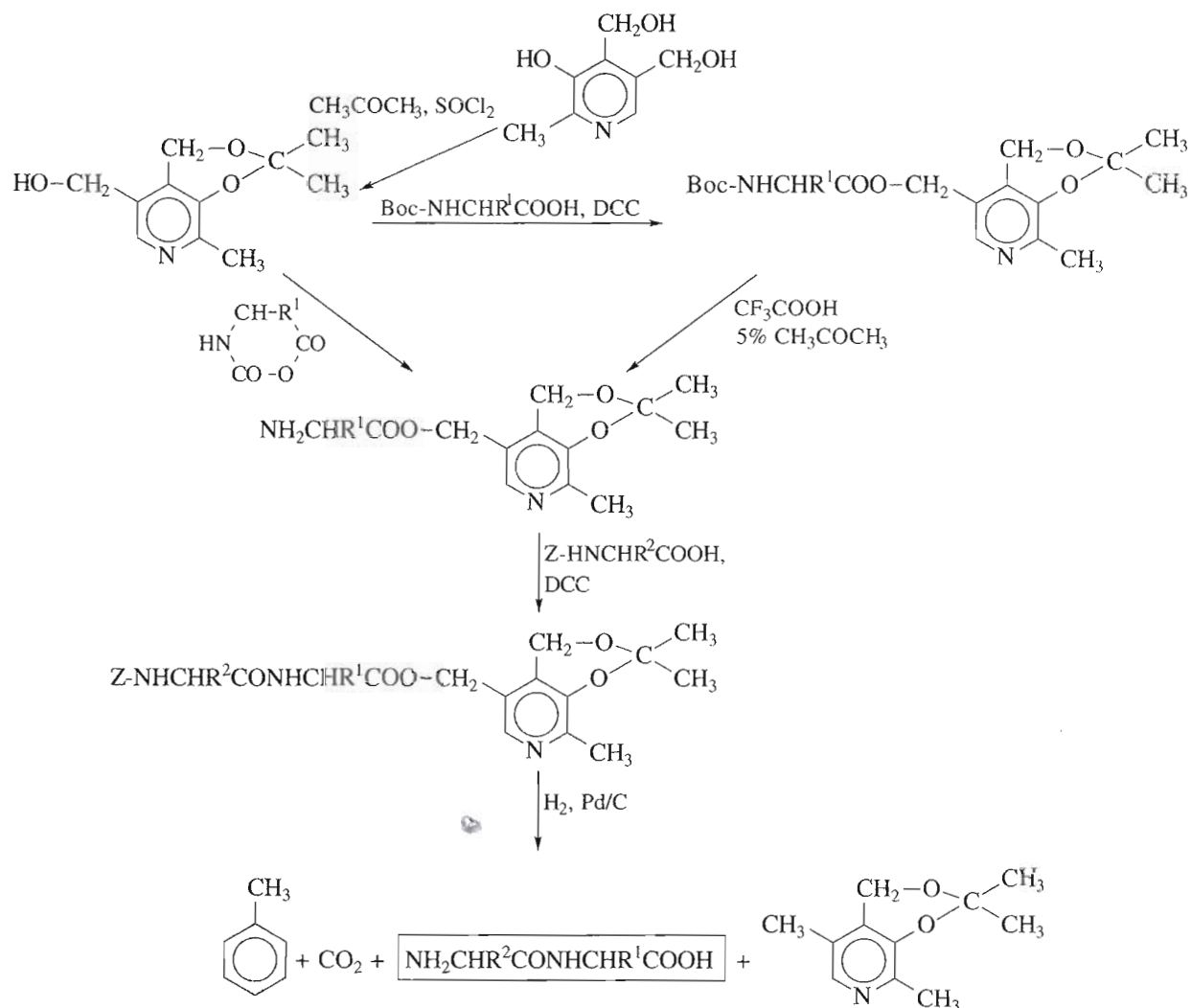


Схема 1. Получение пиридоксин-5'-иловых эфиров аминокислот и их использование в синтезе пептидов.

процессе синтеза полностью защищенных пептидов. Наличие дополнительных защитных групп на пиридоксильном остатке позволило использовать на стадии конденсации обычные растворители (этилацетат, хлороформ) в синтезе плохо растворимых пептидов. Наиболее часто применялись соединения, содержащие кетальные группировки на пиридоксине, поскольку препаративные методы их получения наиболее отработаны [9]. Кроме того, изопропилиденные защитные группы могут быть селективно удалены или заменены на другие дополнительные группы. Соединения, содержащие более устойчивые к кислотному гидролизу циклогексилиденные и пальмитоильные защиты, были также хорошо растворимы в вышеупомянутых растворителях. Высокой растворимостью в полярных растворителях (диметилформид, спирты, вода) обладают пиридоксильные эфиры свободных пептидов, не содержащие дополнительных защит на пиридоксине.

Выбор временных N^α -защитных групп определяется стабильностью пиридоксильных эфиров в условиях создания пептидных связей, снятия временных защитных групп, присоединения к полимерным носителям и химических превращений самой пиридоксильной группы (схемы 1, 2). Поскольку кетальные группы на пиридоксине весьма устойчивы в щелочной среде [11, 12], Fmoc-защита наиболее приемлема [10, 13]. Использование же наиболее распространенных кислототалбильных N^α -защитных групп, учитывая высокую лабильность кеталей (особенно изопропилиденных) при кислотных обработках [12], требует специальных условий. Так, дихлоргидраты или дитрифтор-ацетаты пиридоксильных эфиров, используемые для пептидного синтеза, желательно получать непосредственно перед стадией конденсации, так как из-за гигроскопичности этих солей возможно частичное отщепление изопропилиденной группы при хранении на воздухе (в эксикаторе отщепление

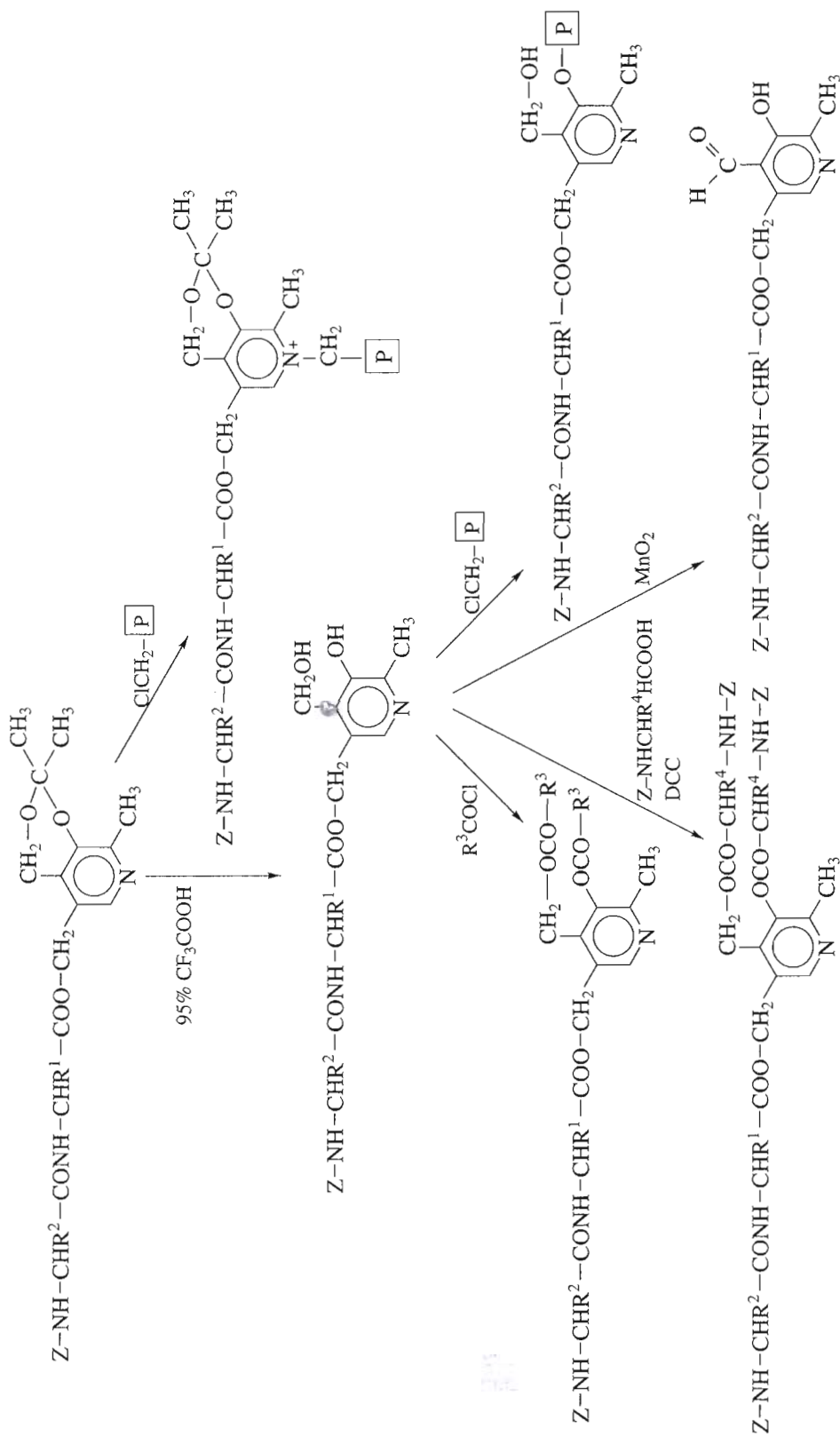


Схема 2. Использование пиридоксильного остатка в качестве защитной группы, слайсера и модификатора.

кетальных групп не наблюдается). Кроме того, пиридоксильные эфиры аминокислот содержат дополнительный пиридиновый азот, который может оказаться акцептором кислотных реагентов (например, пентафторфенола, *N*-гидроксисукцинимид), образующихся в процессе ацилирования активированными эфирами на стадии пептидообразования. Поэтому для нейтрализации на стадии конденсации желателно добавлять два эквивалента третичного амина.

Хроматографический контроль пептидного синтеза легко осуществляется, как и в случае синтеза пиридоксильных эфиров аминокислот [9], благодаря высокой УФ-абсорбции (α 6000 M⁻¹ см⁻¹ при 297 нм) и флуоресценции целевых продуктов. Синтезированные пептиды могут обнаруживаться на ТСХ-пластинках реактивом Гиббса, а также солями железа [14]. Тест Гиббса очень чувствителен и информативен. Этот реагент был вначале предложен для выявления фенольных соединений [15] и окрашивает их в интенсивный голубой цвет. По нашим наблюдениям, он окрашивает также соединения, содержащие свободную сульфгидрильную группу (цистеин), имидазол (гистидин), индол (триптофан), но дает с ними желтую окраску. Этот же реагент позволяет определить степень замещения пиридоксильного остатка; окрашивание наблюдается только после снятия дополнительных групп (например, кетальных, ацильных) в реакционном растворе или непосредственно на пластинке.

Реакция образования пептидной связи с пиридоксильными эфирами аминокислот и пептидов по *N*^α-аминогруппе (при наличии свободных гидроксильных групп на пиридоксиле) возможна в присутствии мягких средств активации карбоксильных групп *C*-компонента (например, *N*-гидроксисукцинимидных и *l*-нитрофениловых эфиров). Метод активированных эфиров целесообразно использовать и при наличии кетальной защиты на пиридоксильном остатке, так как это позволяет избежать образования побочных продуктов, связанных с возможностью дополнительного ацилирования пиридоксильного остатка, например при попадании влаги или спиртов в реакционный раствор [9]. После реакции конденсации целевые продукты выделяются довольно просто: переводением в соль (например, гидрохлорид) или в комплекс с пикриновой кислотой. Промывка или перекристаллизация полученного осадка позволяет отделиться от побочных продуктов. При снятии *N*^α-защитных групп на следующей стадии эти соли сравнительно легко растворяются, что, по-видимому, объясняется уменьшением агрегации пептидных цепей вследствие большей сольватации пиридоксильных производных. В твердофазном синтезе эта агрегация является серьезной причиной уменьшения скорости ацилирования и деблокирования (так называемые трудные последовательности) [1].

Последний шаг синтеза – удаление пиридоксильных защитных групп – не составляет проблем, так как продукты расщепления пиридоксильного эфира – 5-метилпиридоксин (при восстановлении), пиридоксильные кетали и сам пиридоксин (при омылении, аммонолизе или гидролизе) отделяются от свободного пептида благодаря высокой растворимости в органических растворителях и летучести в вакууме. При расщеплении пиридоксильной группы образуются продукты (схема 1), которые обладают свойствами специфически окрашиваться и флуоресцировать, что позволяет контролировать эту стадию синтеза.

С целью иллюстрации использования пиридоксильных эфиров (I)–(VIII) в комбинации с *tert*-бутилоксикарбонильной защитной группой (схема 3) мы приводим синтез додекапептида (XII) из последовательности белка вируса гриппа (предварительное сообщение [16]).

Ранее было показано, что при применении бензильного эфира *C*-концевого глицина в синтезе пептида (IX) (фрагмент 1–8) образуются промежуточные продукты, не растворимые даже в горячем DMF [17]. Поэтому при синтезе этого фрагмента авторы работы [17] были вынуждены использовать реагент *N,O*-бис(триметилсилил)ацетамид, образующий временные силильные производные пептида. Однако даже в этом случае выход целевого продукта был невысоким. Нами без проблем был осуществлен синтез этого плохо растворимого фрагмента на основе пиридоксильного эфира методом *N*-оксисукцинимидных активированных эфиров. Промежуточные защищенные пептиды (III)–(VIII) растворяли в этилацетате или хлороформе. Вос-Защитную группу снимали трифторуксусной кислотой, содержащей 5% (по объему) безводного ацетона, добавляемого непосредственно перед реакцией для сохранения изопропилиденовой группы в присутствии следов влаги, поскольку изопропилиденные производные легко расщепляются в условиях кислого гидролиза.

Гидрогенолиз защищенного пептида (VIII) контролировался тонкослойной хроматографией, причем реактив Гиббса при обнаружении веществ показал большую чувствительность, чем нингидрин. Процесс сопоставим по времени (6 ч) с гидрогенолизом бензильного эфира (XII) (10 ч, [17]). Гидрогенолиз сопровождался образованием кетала 5-метилпиридоксина (2,5-диметил-3-гидрокси-4'-гидрокси-метилпиридина) (см. схему 1) – вещества, интенсивно окрашивающегося реактивом Гиббса в ярко синий цвет. Последующая конденсация карбодиимидным методом с синтезированным бензильным эфиром (X) проходила без всяких осложнений.

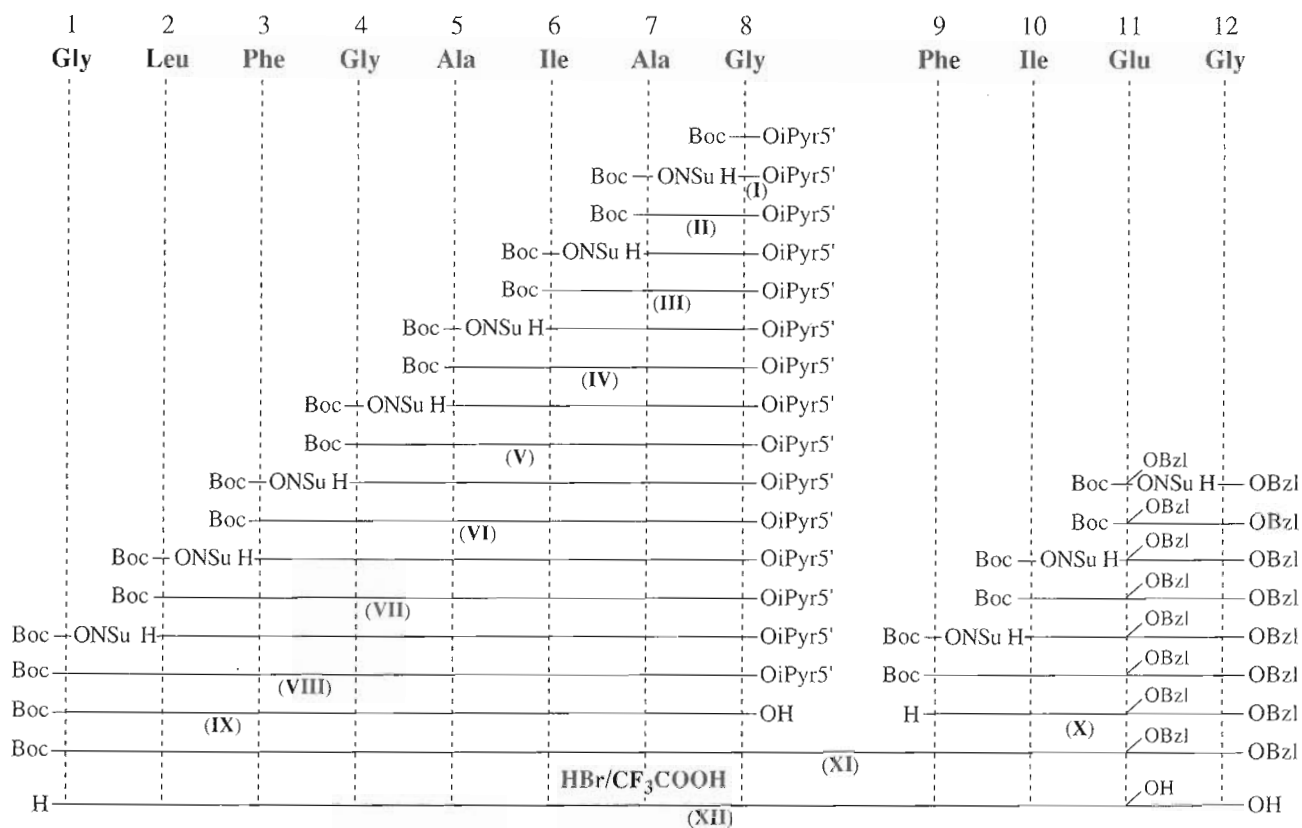
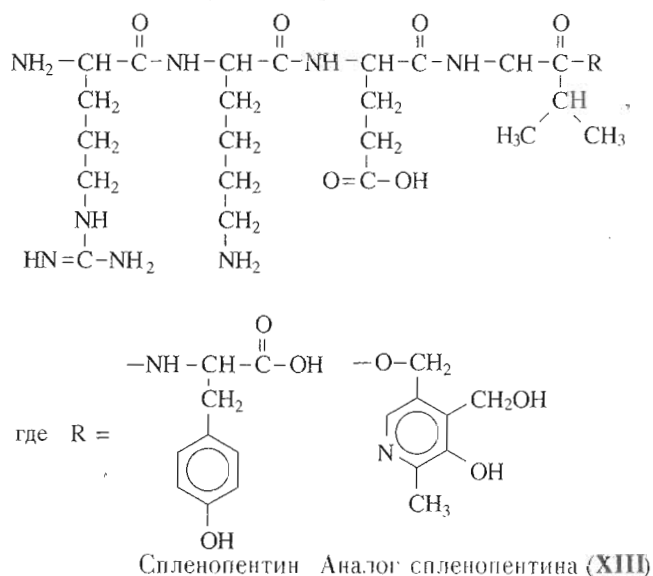


Схема 3. Синтез пептида из гемагглютинаина вируса гриппа.

Не возникло трудностей и при получении гидрофобного октапептида (VIIIa) (таблица), несущего пальмитоильные остатки на пиридоксиле. Синтез в этом случае также проводился из 4',3-изопропилидениридоксилового эфира Вос-глицина. Снятие Вос-защитной и изопропилиденной групп с пептида (III) осуществлялось действием 95% трифторуксусной кислоты, последующее присоединение Вос-аланина проводилось методом *N*-оксисукцинимидных эфиров в хлороформе с последующим пальмитоированием пептида (IVa). Дальнейшее наращивание пептидной цепи проводилось аналогично синтезу октапептида (VIII). Однако обычная обработка трифторуксусной кислотой для снятия Вос-защиты здесь была менее успешной из-за заметной растворимости трифторацетатов пептидов в эфире, применяемом для отделения побочных продуктов и остатков трифторуксусной кислоты. Поэтому Вос-защиту с пальмитоилированными производных снимали 20% HCl в диоксане. Снятие группы, несущей пальмитоильные остатки, с пептида (VIIIa) не проводили. Пальмитоильный остаток на пиридоксиле в качестве спейсера позволил получить липофильную форму пептида (VIII), обладающего повышенной иммуногенностью, сравнимую с более сложно получаемыми высокомолекулярными конъюгатами [16].

Пиридоксильный остаток не удаляли также при синтезе биологически активного аналога спленопентина (таблица, XIII), предварительное сообщение [18]. По-видимому, в этом случае он имитировал радикал ароматической аминокислоты тирозина, поскольку известно, что отсутствие остатка тирозина в молекуле спленопентина или замена его на остаток алифатической аминокислоты ведет к потере специфической активности [19].



Физико-химические характеристики синтезированных соединений

Номер	Соединение	<i>T</i> , пл., °С	$[\alpha]_D, 1\%$ MeOH	<i>R_f</i>	Выход последней стадии синтеза, %
(I)	H-Gly-OiPyr5' (трифторацетат)	53–55		0.55 (Д)	94.7
(Ia)	H-Gly-OiPyr5' (пикрат)	105–107		0.55 (Д)	98
(Iб)	H-Gly-ОсPyr5'(гидрохлорид)	134–136		0.64 (Д)	74
(II)	Вос-Ala-Gly-OiPyr5' *	71–73	–8.9	0.41 (А); 0.35 (Ж)	93.5
(IIa)	Вос-Ala-Gly-ОсPyr5'*	96–98	–6.1	0.50 (А); 0.39 (Ж)	81
(III)	Вос-Ile-Ala-Gly-OiPyr5' *	82–84	–20.8	0.38 (А); 0.71 (Б)	95
(IV)	Вос-Ala-Ile-Ala-Gly-OiPyr5' *	129–131	–49.2	0.23 (А); 0.64 (Б)	96
(IVa)	Вос-Ala-Ile-Ala-Gly-(OPlm) ₂ Pyr5'	110–112	–36.5	0.61 (А); 0.83 (Б)	52
(V)	Вос-Gly-Ala-Ile-Ala-Gly-OiPyr5' *	141–145	–40.8	0.29 (А); 0.58 (Б)	93
(Va)	Вос-Ala-Ile-Ala-Gly-OPyr***	166–169	–37	0.2 (А); 0.43 (Б)	47
(VI)	Вос-Phe-Gly-Ala-Ile-Ala-Gly-OiPyr5' *	138–141	–24	0.1 (А); 0.52 (Б)	95.5
(VII)	Вос-Leu-Phe-Gly-Ala-Ile-Ala-Gly-OiPyr5' **	151–153	–41.8	0.09 (А); 0.68 (Б)	93
(VIII)	Вос-Gly-Leu-Phe-Gly-Ala-Ile-Ala-Gly-OiPyr5' **	148–150	–40.1	0.41 (Б); 0.73 (В)	93.5
(VIIIa)	Вос-Gly-Leu-Phe-Gly-Ala-Ile-Ala-Gly-(OPlm) ₂ Pyr5'	131–133	–36	0.58 (А); 0.74 (Б)	48
(IX)	Вос-Gly-Leu-Phe-Gly-Ala-Ile-Ala-Gly-OH	243–247 с разл.	–38.3	0.64 (Д); 0.38 (Е)	90.9
(XI)	Вос-Gly-Leu-Phe-Gly-Ala-Ile-Ala-Gly- Phe-Ile-Glu(OBzl)- Gly-OBzl	267–269	–23		82
(XII)	H-Gly-Leu-Phe-Ala-Ile-Ala-Gly-Phe-Ile-Glu-Gly-OH	289–291 с разл.	–30	0.6 (Д); 0.35 (Е)	98
(XIII)	H-Arg-Lys-Glu-Val-OPyr5'***	188–190	–29	0.11 (А); 0.2 (Д)	79
(XIV)	Вос-Leu-Phe-OiPyr5'*	92.5–94	–7.5	0.91 (Д); 0.41 (Ж)	96
(XV)	Вос-Met-Leu-Phe-OiPyr5' *	120–123	–8.8	0.8 (Д); 0.38 (Ж)	95
(XVa)	H-Met-Leu-Phe-OiPyr5'	207–210	–8.1	0.28 (А); 0.61 (Д)	90
(XVI)	For-Met-Leu-Phe-OiPyr5'	146–148	–15.8	0.5 (А); 0.77 (А)	95
(XVII)	For-Met-Leu-Phe-OH	212–214			95
(XVIII)	H-Cys(Pyr5')-Ala-Pro-OH***	176–180	–12.8	0.1 (В); 0.26 (Д)	84
(XIX)	Z-Cys(Pyr5')-Pro-OPyr5'(гидрохлорид)	142–145	–11.4	0.55 (А); 0.72 (В)	80

* Перекристаллизован из смеси этилацетат–петролейный эфир (1 : 1); ** перекристаллизован из смеси хлороформ–петролейный эфир (1 : 1); *** перекристаллизован из смеси изопропиловый спирт–гексан (1 : 1).

Аналогичный подход был использован в синтезе пиридоксилового эфира пептида хемотаксиса (XVII). Наличие пиридоксилового эфира на С-конце позволило провести формилирование (схема 4) избытком уксусномуравьиного ангидрида без образования рацемата. Пиридоксильный эфир пептида хемотаксиса (XVI) показал большую биологическую активность, чем сам пептид хемотаксиса (XVII) [16]. Кроме того, он лучше растворялся в воде, что позволило исключить диметилсульфоксид из клеточной среды и тем самым обеспечить более объективную оценку фагоцитарной активности в клинической иммунологии [20]. Омыление пиридоксилового эфира (XVI)

проводили в условиях, разработанных ранее [9]. Омыление проходило без осложнений. Твердофазный синтез этого пептида описан ниже.

Комбинация Вос-аминокислот и пиридоксилового эфира H-Lys(Z(Cl))-OiPyr5' была успешно использована нами также в синтезе пептидов контактного взаимодействия клеток и их флуоресцентных аналогов [16]. Наши попытки осуществить этот синтез, начиная со свободного H-Lys(Z(Cl))-OBzl, приводили к образованию трудноотделимых примесей вследствие плохой кристаллизруемости промежуточных пептидов.

Снятие Вос-группы действием муравьиной, трифторуксусной кислоты или насыщенным рас-

твором хлористого водорода в диоксане с добавлением 5% воды приводит к одновременному удалению изопропилиденовой защитной группы [9] с получением соединений, обладающих комплексобразующими свойствами. Эти свойства пиридоксильных производных были использованы нами для получения ингибиторов металлоферментов, в том числе ингибитора ангиотензинпревращающего фермента (схема 5) [21]. Кроме того, наличие сближенных гидроксильных групп у пиридоксильных производных пептидов может служить основой синтеза диольных ингибиторов ВИЧ-протеиназ, как это было показано в работе [22].

Таким образом, *трет*-бутилоксикарбонильная группа может быть применена в качестве временной N^α -защитной группы в сочетании с постоянной пиридоксильной группой, несущей дополнительные кислотолabile (кетальные) группировки. Удаление *Boc*-защиты требует определенных условий – отсутствия влаги в трифторуксусной кислоте и в некоторых случаях использования хлористого водорода. Так, при синтезе гидрофобных пептидов или использовании более гидрофобных, чем изопропилиденовые, циклогексидиленовых производных пиридоксина, предпочтительнее использовать для снятия *Boc*-защиты хлористый водород, а не трифторуксусную кислоту. Кроме того, было отмечено [23], что длительный нагрев (60–80°C) при упаривании (в случае плохого вакуума и большой загрузки) трифторуксусной кислоты, содержащей ~1% воды, приводит не только к отщеплению кетальной защиты, но и к поликонденсации пиридоксильных остатков вследствие высокой реакционной способности гидроксиметильной группы в 4-м положении молекулы пиридоксина. С другой стороны, легкость и регулируемость этого процесса поликонденсации [24] может быть использована в синтетических целях, например, для перехода от мономолекулярной защитной группы к полимерной. По-видимому, в результате этого процесса могут быть получены мультиплетные пептиды и конъюгаты [25].

Как и ожидалось, использование пиридоксильных производных в комбинации с *Boc*-аминокислотами в твердофазном синтезе не вызвало осложнений. Отмечена большая набухаемость пептидилполимеров в синтезе детерминантов белков ВИЧ и пептидов для диагностики Пептоскрин [26]. В твердофазном синтезе пептидов пиридоксильный остаток может играть роль спейсерной группы вследствие легкости алкилирования хлорметильными группами полимерного носителя или благодаря реакции альдегидной группы пиридоксала с аминокислотой, связанной с полимерным носителем [27, 28] (схема 2). Устойчивость спейсера к HF, HBr и другим кислотным реагентам позволяет получать в конце синтеза

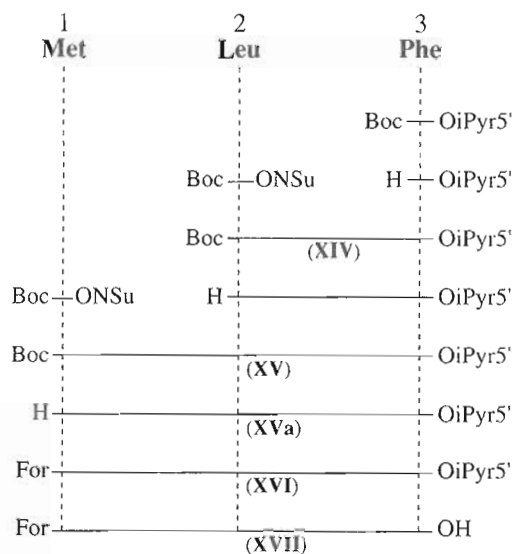


Схема 4. Синтез пептида хемотаксиса (предварительное сообщение [20]).

свободные пептиды, присоединенные к носителю (например, иммуносорбенты, иммуногены и циклопептиды). При необходимости свободные пептиды могут быть отщеплены в мягких условиях омылением, аммонолизом, гидразинолизом, гидрированием или фотолизом (см. синтез соединения (XVII)).

Таким образом, как в классическом, так и в твердофазном синтезах пептидов возможно использование комбинации временных *Boc*-защитных групп и постоянной пиридоксильной защитной группы; изопропилиденовая группа может быть удалена одновременно с *Boc*-защитной группой действием 95% трифторуксусной кислоты. Использование другой, более устойчивой кислотолabile группы (бензилоксикарбонильной) в комбинации с пиридоксильными защитными имеет свои особенности: обе группы могут быть удалены одновременно гидрированием (схема 1) или кетальные группы с пиридоксильного остатка могут быть селективно удалены в условиях мягкого кислого гидролиза, как например, в синтезе пептида (XIX). Процедура селективного снятия кетальных групп необходима для введения в пиридоксильный остаток других заместителей, в том числе аминокислот [9].

Пиридоксильные производные могут быть использованы в синтезе библиотек мультиплетных пептидов, так как позволяют синтезировать кор с тремя уровнями разветвления (схема 6) [28, 29], что придает кору способность к селективному расщеплению. Так, щелочной обработкой омыляются 3-*O*-, 4'-*O*- и 5'-*O*-пиридоксильные эфиры, а 3-*O*-пиридоксильная группа может отщепляться действием HF [9]. Получаемые линейные

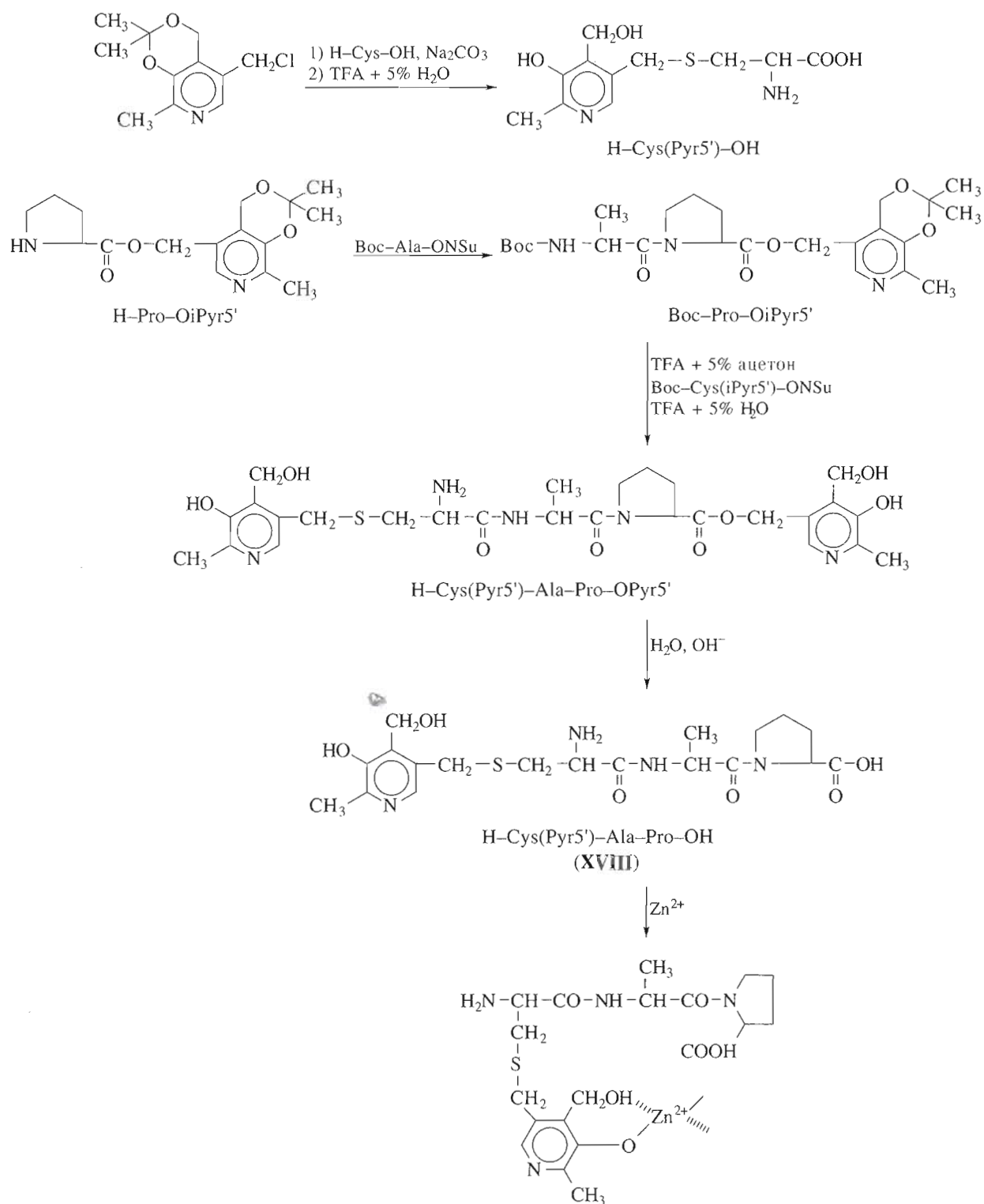


Схема 5. Синтез *S*-пиридоксин-5'-илцистеинилаланилпролина – пептидного ингибитора ангиотензинпревращающего фермента. Показана одна из возможных структур комплекса с Zn(II) [29].

пептиды могут служить для анализа синтезированного мультиплетта, что особо рассмотрено в работе [30]. Например, для мультиплетного корра на основе *S*-пиридоксин-5'-илцистеина центрами

для присоединения и последующего синтеза на носителе служат три аминогруппы цистеинового остатка и шесть гидроксильных групп пиридоксильных остатков (схема 6). β-Аланин и глицин вве-

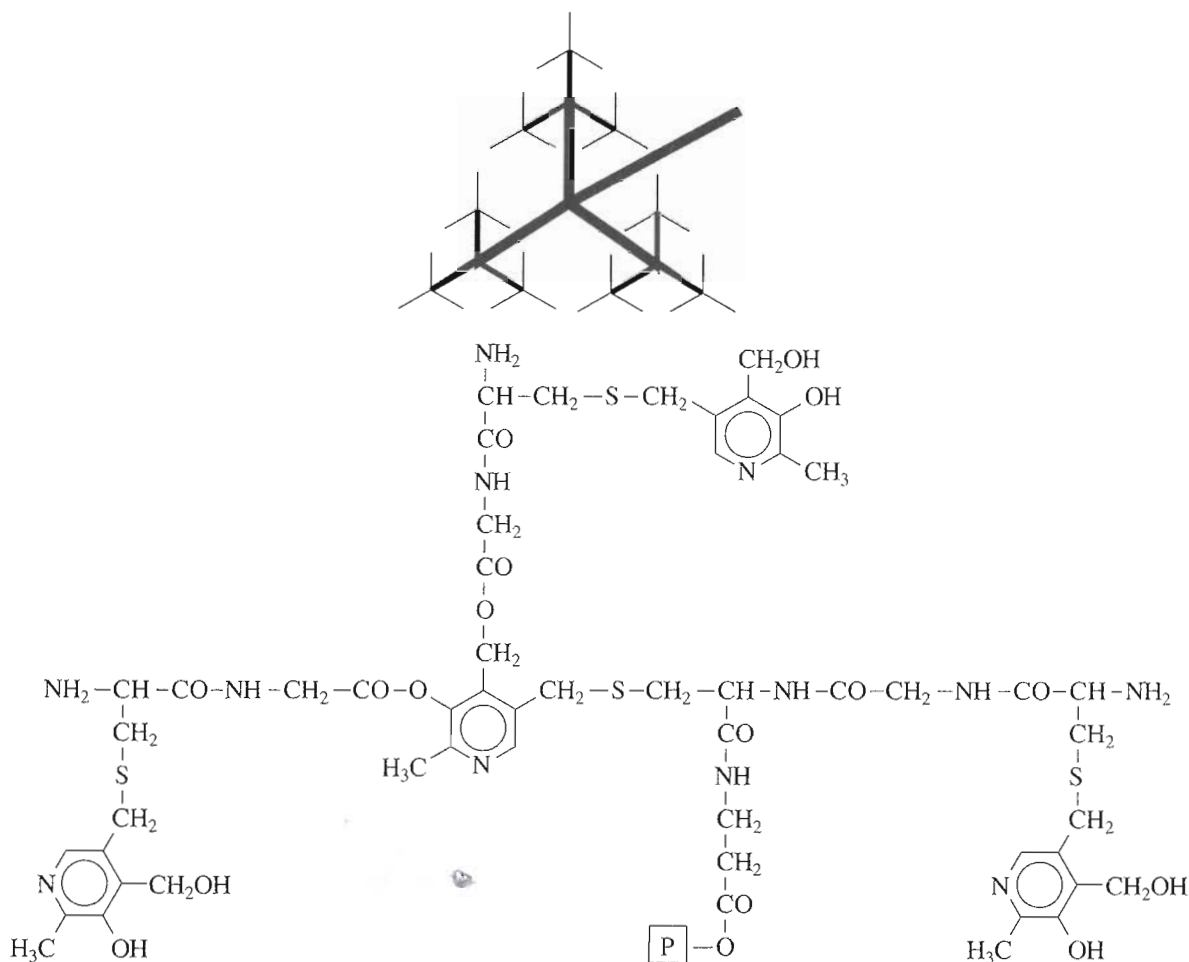


Схема 6. Фрагмент разветвленного кора мультиплетного пептида на основе *S*-пиридоксин-5'-илцистеина; графическое изображение (три уровня разветвления) свободного мультиплета.

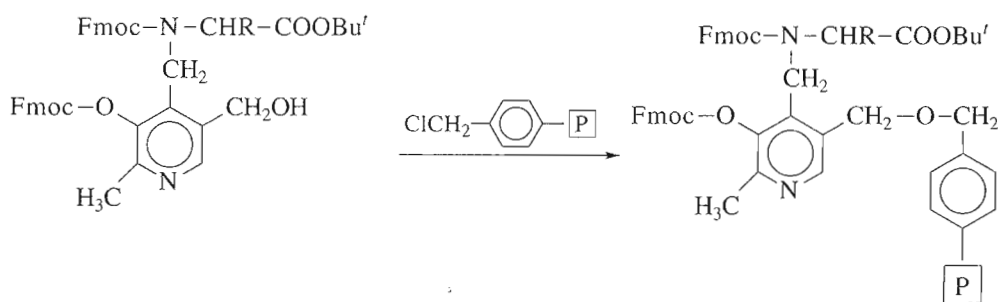


Схема 7. Присоединение исходных *N*-пиридоксиламинокислот к носителю (гипотетическая схема).

дены для уменьшения стерических препятствий, они также служат внутренними стандартами при аминокислотном анализе мультиплета.

N-Пиридоксиламинокислоты, легко получаемые из пиридоксаля [31], могут служить исходными соединениями для синтеза производных аминокислот, в которых должно быть два разных протективных заместителя при α -аминогруппе.

Преимущество *N*^o-пиридоксильных производных перед предложенными ранее [1] – возможность их присоединения к полимерному носителю, как и в случае пиридоксильных эфиров (схема 2), за счет дополнительных функций пиридоксильного остатка с последующим синтезом линейной цепи и осуществления циклизации на этом же носителе. Обычно с этой целью используются поли-

функциональные аминокислоты [29–35], что ограничивает возможности получения циклических пептидов. Нами предложена гипотетическая схема синтеза полимерного носителя (схема 7) для получения циклических пептидов.

По-видимому, учитывая комплексообразующие свойства и легкую трансформацию гидроксильных в галоген или альдегид (схема 2) [10, 13], наиболее перспективным является использование пиридоксильных производных в качестве синтонов в получении пептидомиметиков [29], где необходимо наличие реакционноспособных групп, например, в синтезе ингибиторов (схема 5).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Температуры плавления (нескорректированные) определяли на приборе Voetius. ТСХ выполняли на силикагелевых пластинках (Kieselgel GF 254, Merck) в системах растворителей: этилацетат–метанол–уксусная кислота, 10 : 1 : 0.1 (А); хлороформ–метанол, 3 : 1 (Б); хлороформ–метанол–уксусная кислота, 3 : 1 : 0.3 (В); ацетон–диоксан–25% аммиак, 9 : 9 : 2 (Г); *n*-бутанол–уксусная кислота–вода, 3 : 1 : 1 (Д); 2-пропанол–25% аммиак, 3 : 7 (Е); этилацетат (Ж). Углы удельного оптического вращения измерялись на приборе Perkin-Elmer Model 141. Строение всех синтезированных соединений подтверждено данными аминокислотного анализа, выполненного на аминокислотном анализаторе Biotronik LC 5001 после гидролиза в 6 н. HCl при 110°C в течение 18–24 ч.

1. Общий метод синтеза солей 4',3-О-изопропилиден-, циклогексилиден- или дипальмитоилпиридоксин-5'-иловых эфиров аминокислот и пептидов. К охлажденному до 0°C раствору 1.84 ммоль 4',3-О-изопропилиденпиридоксин-5'-иловому эфиру *трет*-бутилоксикарбониламино кислоты, полученному как описано в работе [9], или пептида в 10 мл хлороформа прибавляли 10 мл CF₃COOH или 20 мл 20% раствора HCl в диоксане и 0.5 мл безводного ацетона или 20 мл 20% раствора HCl в диоксане в случае синтеза (IVa), (VIIIa). Реакционную смесь перемешивали 30 мин при комнатной температуре, упаривали, промывали эфиром, выпавший продукт сушили. Например, получили 0.89 г **H-Gly-OiPyr5' · 2TFA (I)**. Обработка этого продукта эквимольным количеством пикриновой кислоты дает с количественным выходом кристаллический пикрат (Ia).

Аналогично получили 0.56 г циклогексилиденового производного **H-Gly-OcPyr · 2HCl (Ib)**. В этом случае к раствору HCl в диоксане добавляли 0.5 мл циклогексанона.

1а. Общий метод синтеза солей пиридоксин-5'-иловых эфиров аминокислот и пептидов. К охлажденному до 0°C раствору 1 ммоль 4',3-О-изопропилиденпиридоксин-5'-иловому эфиру аминокислоты [9] или пептида в 10 мл 20% раствора HCl в диоксане или в 10 мл CF₃COOH прибавляли 0.5 мл дистиллированной воды. Реакционный раствор перемешивали 1 ч при комнатной температуре, упаривали в вакууме, осадок промывали эфиром и высушивали. Например, получили 0.57 г **Z-Cys(Pyr5')-Ala-Pro-OH · HCl (XIX)**.

2. Общий метод создания пептидной связи с использованием 4',3-О-изопропилиден-, циклогексилиден- или дипальмитоилпиридоксин-5'-иловых эфиров аминокислот и пептидов (II)–(VIII), (IIa), (IVa), (VIIIa), (XIV), (XV), (XVa), (XVI). К 5 ммоль аминокислоты, полученного по методу 1, прибавляли 1.39 мл (10 ммоль) триэтиламина в 30 мл хлористого метилена или DMF и 5 ммоль *N*-гидроксисукцинимидного эфира *трет*-бутилоксикарбониламино кислоты. Смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре 18 ч, затем упаривали в вакууме досуха, а остаток растворяли в 40 мл этилацетата. Полученный раствор промывали 5% NaHCO₃, водой, 3% лимонной кислотой (30 мл × 3), 5% NaHCO₃ и снова водой. Органический слой высушивали над Na₂SO₄ и упаривали в вакууме. Остаток перекристаллизовывали из подходящего растворителя (таблица).

2а. Общий метод создания пептидной связи с использованием пиридоксин-5'-иловых эфиров аминокислот и пептидов (Va). К 5 ммоль аминокислоты, полученного по методу 1а, прибавляли 1.39 мл (10 ммоль) триэтиламина и 5 ммоль *N*-гидроксисукцинимидного эфира *трет*-бутилоксикарбониламино кислоты. Смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре 18 ч, затем упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в 40 мл *n*-бутанола и промывали насыщенным раствором NaCl, содержащего 3% уксусной кислоты, и насыщенным раствором NaHCO₃. Бутанол упаривали и остаток кристаллизовывали из смеси изопропиловый спирт : гексан (1 : 1).

Вос-Ala-Ile-Ala-Gly-(OPIm)₂Pyr5' (IVa). К раствору 0.9 г (1.6 ммоль) **Вос-Ile-Ala-Gly-OPyr5'**, полученному по методу 2а, в 10 мл хлороформа, содержащего 2 мл пиридина, при 0°C прибавляли в течение часа 0.9 мл (3.2 ммоль) хлорангидрида пальмитиновой кислоты в 5 мл хлороформа. Смесь выдерживали 18 ч при комнатной температуре и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в этилацетате, промывали 3% раствором лимонной кислоты, водой, 5% раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и упаривали в вакууме. Остаток перекристаллизовывали из смеси изопропиловый спирт : гексан (1 : 1). Получили 0.78 г продукта (IVa).

Вос-Gly-Leu-Phe-Gly-Ala-Ile-Ala-Gly-OH (IX). Раствор 1.09 г (1.1 ммоль) **Вос-Gly-Leu-Phe-Gly-Ala-Ile-Ala-Gly-OiPyr5' (VIII)** в 30 мл метанола гидрировали над Pd/C в течение 6 ч. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакуу-

ме, остаток кристаллизовали из 2-пропанола. Выход 0.80 г.

H-Gly-Leu-Phe-Ala-Ile-Ala-Gly-Phe-Ile-Glu-Gly-OH (XII). Раствор 0.8 г (1.0 ммоль) октапептида (IX) в 30 мл DMF смешивали при 0°C с раствором 0.683 г (3.6 ммоль) пентафторфенола и 0.258 г (1.2 ммоль) DCC в 10 мл DMF, после чего в реакционную смесь вносили 0.645 г (1.0 ммоль) тетрапептида (X), полученного ранее [17]. Смесь перемешивали 4 ч. Выпавший осадок промывали на фильтре метанолом и эфиром. Получали 1.18 г (82%) додекапептида (XI), который подвергали обработке бромистым водородом в трифторуксусной кислоте (насыщенный раствор) с последующим высаживанием абсолютным эфиром и фильтрованием. Осадок промывали на фильтре сухим этилацетатом и высушивали в вакууме. Выход целевого продукта 0.98 г (98% в расчете на (XI)).

For-Met-Leu-Phe-OiPyr5' (XVI). К смеси 7.28 г (80 ммоль) формиата натрия и 7.55 мл (200 ммоль) муравьиной кислоты при 0°C прибавляли 9.43 г (100 ммоль) уксусного ангидрида. К полученному раствору прибавляли 3.09 г Met-Leu-Phe-OiPyr5' · 2HCl (XVa) (4.6 ммоль), полученному из (XV) по методу 1. Смесь перемешивали 20 мин при 0°C и 1 ч при комнатной температуре, после чего к смеси добавляли 100 мл диэтилового эфира. Выпавший осадок отделяли и промывали дистиллированной водой (5 × 5 мл), диэтиловым эфиром, гексаном, высушивали в вакууме, кристаллизовали из 2-пропанола. Получили 2.75 г эфира (XVI).

For-Met-Leu-Phe-OH (XVII). Растворяли 2.75 г (4.37 ммоль) For-Met-Leu-Phe-OiPyr5' при комнатной температуре в смеси 50 мл метанола и 10 мл 2 н. NaOH и оставляли перемешиваться в течение 20 мин, после чего смесь нейтрализовали ледяной уксусной кислотой и упаривали досуха. Остаток растворяли в этилацетате и промывали водой, затем отфильтровывали, промывали сухим эфиром, высушивали и перекристаллизовывали из смеси 2-пропанола и гексана. Выход 1.72 г.

Твердофазный синтез For-Met-Leu-Phe-OH (XVII).

а). Присоединение Вос-Phe-OiPyr5' к полимерному носителю (схема 2). 0.228 г (0.50 ммоль) Вос-Phe-OiPyr5', 50 мг KI, 50 мг NaHCO₃ и 0.8 г хлорметилированного полимера стирола с 1% дивинилбензола (1.4 ммоль хлора на 1.0 г носителя) суспендировали в 2 мл DMF. Смесь выдерживали 24 ч при 80°C (наблюдалось красно-коричневое окрашивание полимера), отфильтровывали, промывали DMF (3 × 1 мл), 50% метанолом, эфиром и высушивали в вакууме. Содержание Вос-Phe-OiPyr5', определенное количественным аминокислотным анализом, составило 0.24 ммоль на 1 г полимера.

б). For-Met-Leu-Phe-OiPyr5'-полимера. К 0.5 г полимера, содержащего 0.12 ммоль Вос-Phe-

OiPyr5', добавляли 6 мл 50% смеси CF₃COOH и CH₂Cl₂, 0.6 мл ацетона и выдерживали 30 мин. Полимер отфильтровывали, промывали хлористым метиленом (3 × 6 мл), эфиром. Трифторацетат нейтрализовывали 3% раствором триэтиламина в хлороформе (3 мл, 5 мин) и промывали хлороформом (2 × 3 мл) и эфиром.

К полученному носителю добавляли 0.84 г (0.36 ммоль) безводного Вос-Leu-OH в 3 мл хлористого метилена и охлажденный до 0°C раствор 0.8 г (0.38 ммоль) DCC в 3 мл хлористого метилена. Смесь перемешивали 2 ч при комнатной температуре, отмывали дициклогексилмочевину хлористым метиленом и повторяли стадию нейтрализации и ацилирования. Аналогично присоединяли Вос-Met-OH. Формилирование проводили при 0°C на полимере (после стадии нейтрализации) смешанным ангидридом муравьиной и уксусной кислот, приготовленным непосредственно из 0.75 мл муравьиной кислоты так же, как и при получении For-Met-Leu-Phe-OiPyr5' (XVI). Перед добавлением к нейтрализованному полимеру ангидрид растворяли в 3 мл DMF при 0°C. Пептидилполимер выдерживали еще 1 ч при 20°C, отфильтровывали и промывали DMF, 50% метанолом и эфиром и высушивали в вакууме. Количественный аминокислотный анализ показал содержание пептида (XVII) – 0.11 ммоль/г.

в). Фотолиз For-Met-Leu-Phe-OiPyr5'-полимера. Суспензию 0.45 г пептидилполимера, содержащего 0.049 ммоль пептида (XVII), 15 мг NH₄Cl в 1.5 мл 50% метанола, в 2 мл кварцевой кювете облучали 18 ч лампой "SYLVAVIA" Blacklight Blue BW-8W [36]. Полимер отфильтровывали, промывали 50% метанолом (3 мл × 3) и высушивали. Количественный аминокислотный анализ алиquotной части полимера (содержание пептида – 0.079 ммоль/г) показал, что отщепилось 28% пептида. Фильтрат упарили в вакууме, остаток растворяли в 0.5 мл метанола и нанесли на колонку (0.5 × 10 см) с силикагелем и элюировали смесью хлороформ/метанол. Фракции, содержащие пептид, собрали и упарили. Получили 5.1 мг (0.011 ммоль) формилпептида, по своим характеристикам идентичного пептиду, полученному при синтезе в растворе (таблица) (XVII).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Johnson T., Quibell M., Sheppard R.C. // Pept. Sci. 1995. V. 1. P. 11–25.
2. Медведкин В.Н., Заболотских В.Ф., Пермяков Е.А., Митин Ю.В., Сорокина М.Н., Клименко Л.В. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 684–690.
3. Henkel B., Goldammer C., Bayer E. // Peptides 1996 / Eds Robert Ramage and Roger Epton. EPS, 1998. P. 469–470.
4. Tam J.P., DiMarchi R.D., Merrifield R.B. // Int. J. Peptide Protein Res. 1980. V. 16. P. 412–425.

5. *Meisenbach M., Echner M., Voelter W.* // Peptides 1996 / Eds Robert Ramage and Roger Epton. EPS, 1998. P. 633–634.
6. *Гершкович А.А.* // Биоорганич. химия. 1991. Т. 17. С. 869–899.
7. *Пожарский А.Ф., Солдатенков А.Т.* // Молекулы-перстни. М.: Химия, 1993. С. 226.
8. *Островский В.А., Малин А.А.* // Русский журн. "ВИЧ/СПИД и родственные проблемы". 1998. Т. 2. С. 61–67.
9. *Скляр Л.Ю., Сбитнева И.Н., Копина Н.А.* // Биоорганич. химия. 1999. Т. 25. С. 643–651.
10. *Sklyarov L., Nikolaev A., Kopina N.* // Proc. of the 20th EPS. Tubingen. 1988 / Eds Jung G., Bayer E., Gruter W. Berlin, New York, 1989. P. 85–87.
11. *Korytnyk W., Srivastava S.L., Angelino W., Potti P.G.G., Paul B.* // J. Med. Chem. 1973. V. 16. P. 1096–1101.
12. *Защитные группы в органической химии.* Ред. Дж. МакОми. М.: Мир, 1976. С. 121.
13. *Imperiali B., Roy R.* // J. Am. Chem. Soc. 1994. V. 116. P. 12083–12084.
14. *Шнайман Л.О.* Производство витаминов. М.: Пищевая промышленность, 1973. С. 154.
15. *Dacre J.C.* // Anal. Chem. 1971. V. 43. P. 589–591.
16. *Скляр Л.Ю., Николаев А.Ю., Копина Н.А.* // Итоги науки и техники. Иммунология. 1988. Т. 26. С. 37–42.
17. *Хаитов Р.М., Андреев С.М., Фомина Л.А., Ракова О.А.* Додекапептид как промежуточное соединение для синтеза иммобилизованных пептидов: А. с. 1300913 СССР // БИ. 1986.
18. *Скляр Л.Ю., Копина Н.А., Сбитнева И.Н.* // VIII Всес. симп. по химии пептидов. Юрмала. 10–12 апреля 1990 / Ред. Иванов В.Т. Рига, 1990. С. 106.
19. *Клуша В.Е., Муценице Р.К., Свирскис Ш.В., Лиена И.Р., Андерматис А.В.* // VIII Всес. симп. по химии пептидов. Юрмала. 10–12 апреля 1990 / Ред. Иванов В.Т. Рига, 1990. С. 21.
20. *Барсуков А.А., Скляр Л.Ю., Ветошкин А.И., Азьмуко А.А., Земсков В.М.* // VII Всес. симп. по химии белков и пептидов. Таллинн, 1987. С. 153.
21. *Sklyarov L.Yu., Sbitneva I.N., Kopina N.A., Kugaevskaja E.V.* // J. Am. Biotech. Lab. 1994. № 8. P. 12–13.
22. *Kim C.U.* // J. Med. Chem. 1996. V. 39. P. 3431–3434.
23. *Harris E.E., Zabriskie J.L., Chamberlin F.M., Grane J.P., Peterson E.R., Renter W.* // J. Org. Chem. 1969. V. 34. P. 1993.
24. *McCasland G.E., Kenneth Gottwald L., Furst A.* // J. Org. Chem. 1961. V. 26. P. 3541.
25. *Скляр Л.Ю., Копина Н.А., Золина Н.Н.* // Mat. V Всес. биохим. конгресса. М.: Наука, 1986. С. 29–30.
26. *Петров Р.В., Хаитов Р.М., Фомина Л.Д., Сидорович И.Г., Скляр Л.Ю., Лиознер А.Л., Николаев А.Ю., Николаева И.А., Иващенко М.Е., Павликов С.П., Ефремова Е.В., Рассули А.М.* Пептид, связывающий ангитела к вирусу иммунодефицита человека: А. с. 1541821 СССР // БИ. 1989.
27. *Korytnyk W., Ahrens H.* // J. Heter. Chem. 1970. V. 7. P. 1013–1017.
28. *Sklyarov L.Yu., Sbitneva I.N., Kopina N.A.* // Proc. 24th EPS. 1996. Leiden: Escom, 1996.
29. *Sklyarov L.Yu., Sbitneva I.N., Kopina N.A.* // Lett. in Peptide Science. 1995. V. 2. P. 247–252.
30. *Hool Honc Keah, Kecorius E., Hearn M.T.W.* // J. Pept. Res. 1998. V. 51. P. 2–8.
31. *Casella L., Gullotti M.* // J. Am. Chem. Soc. 1983. V. 105. P. 803–809.
32. *Скляр Л.Ю., Шаикова М.В.* // Журн. общей химии. 1969. Т. 39. С. 2714–2717.
33. *Spatola A.F., Romanovska I., Romanovskis P., Wen J.J.* // Proc. 23th EPS. 1994. / Ed. Maia H.L.S. Leiden: Escom, 1995. P. 96–97.
34. *Romanovskis P., Spatola F.* // Peptides 1996 / Eds Robert Ramage and Roger Epton. EPS, 1998. P. 761–762.
35. *Rovertto P., Quartary L., Fabbri C.* // Tetr. Lett. 1992. V. 32. P. 2639–2642.
36. *Patchornik A., Amit B., Woodward R.B.* // J. Am. Chem. Soc. 1970. V. 92. P. 6333–6335.

Amino Acid Pyridoxyl Esters in Peptide Synthesis

L. Yu. Sklyarov[#], I. N. Sbitneva, N. A. Kopina, and I. G. Sidorovich

State Research Center–Institute of Immunology, 24-2 Kashirskoe sh., Moscow, 115478 Russia

Pyridoxyl residue was suggested to be used as a multifunctional protective and modifying group in peptide synthesis. The modification was carried out by introducing the pyridoxyl residue in free or partially protected peptides or by the addition of amino acid pyridoxyl esters by the methods of conventional peptide synthesis without the removal of the pyridoxyl group at the terminal stages of the synthesis (the second approach is more convenient). Pyridoxyl residue was also used as a spacer in solid phase peptide synthesis. It was attached to the polymer by the alkylation of the hydroxyl groups or of the pyridine ring of the pyridoxyl derivatives with the chloromethylated styrene-divinylbenzene copolymer (the standard Merrifield resin). Potentials for the use of pyridoxyl derivatives in the synthesis of linear, multiplet, and cyclic peptides are discussed.

Key words: amino acid 5'-pyridoxyl esters, new carboxylic protective groups, ketals, peptide synthesis

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 111-8344.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 4. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.